

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/109

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J3-0589
Naslov projekta	MOLEKULARNI MEHANIZEM PRTEPOZNAVANJA DVOVERIŽNE RNA VIRUSOV PREKO TLR3
Vodja projekta	6628 Roman Jerala
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	2.085
Cenovni razred	D
Trajanje projekta	02.2008 - 01.2011
Nosilna raziskovalna organizacija	104 Kemijski inštitut
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Družbeno-ekonomski cilj	13. Splošni napredek znanja - RiR financiran iz drugih virov (ne iz splošnih univerzitetnih fondov - SUF)

1.1. Družbeno-ekonomski cilj¹

Šifra	07.
Naziv	Zdravje

2. Sofinancerji²

1.	Naziv	
	Naslov	
2.	Naziv	
	Naslov	
3.	Naziv	
	Naslov	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta³

PRVI DEL: Molekularni mehanizem prepoznavanja dvoverižne RNA virusov z receptorjem TLR3

Eno od pomembnejših področij naših raziskav so mehanizmi naravne imunosti, katerih naloga je varovanje gostitelja pred okužbami. Obramba temelji na ločevanju lastnih biomolekul od tujih. Receptorji naravne imunosti prepoznavajo molekulske vzorce, značilne za patogene, PAMP, zato jih uvrščamo v skupino PRR (ang. pattern recognition receptors). Po vezavi PAMP ti receptorji sprožijo nastajanje vnetnih citokinov, kemokinov in drugih molekul, ki sprožijo vnetje, katerega namen je omejitev okužbe in uničenje patogena. Pomembna skupina receptorjev PRR je družina transmembranskih receptorjev TLR, ki šteje pri sesalcih trinajst znanih članov. S podkvasto ektodomeno prepoznavajo glikolipide, dsRNA, LPS, flagelin, ssRNA, CpG oligonukleotide in druge mikrobnе vzorce ali njihove sintetične analoge. Vezava ligandov povzroči dimerizacijo receptorjev in prenos signala preko citosolnih domen TIR na nadaljnjo signalno pot.

Med receptorji TLR je TLR3 odgovoren za obrambo proti okužbam z virusi. Najdemo ga odvisno od tipa celic v endosomih ali na celični membrani, kjer zaznava prisotnost dsRNA, ki je značilna predvsem za viruse. Ob vezavi dsRNA ali sintetičnega analoga poli(I:C) pride do dimerizacije in posledično aktivacije receptorskega kompleksa, ki prenese preko dimera domen TIR signal na adaptersko molekulo TRIF in ne MyD88, kot pri ostalih TLR. TRIF aktivira zaporedje kinaz, ki končno aktivirajo transkripcijske dejavnike NF- κ B, AP-1 in IRF3. Prva dva sprožita transkripcijo genov za vnetne citokine, IRF3 pa genov za interferone tipa I.

Po razkritju kristalne strukture ektodomene človeškega TLR3 in z usmerjeno mutagenezo posameznih aminokislinskih ostankov so odkrili C-končno vezavno mesto z dsRNA, ki zajema H539 in N541 (Bell in sod., 2006a; Ranjith-Kumar in sod., 2007). Predstavljen je bil model vezave, v katerem se dsRNA veže na C-končni del neglikozilirane strani ektodomene. Pri tem tvori polarna stranska skupina N541 najverjetneje vodikovo vez z 2'-hidroksilno skupino riboze, imidazolni obroč H539, ki je v kislem okolju endosoma pozitivno nabit pa elektrostatsko interakcijo s fosfatnim ogrodjem dsRNA. C-končno vezavno mesto se stika z dsRNA v malem jarku. Druga ektodomena se veže na dsRNA z nasprotne strani, obrnjena za 180 ° in rahlo zamaknjena vzdolž vijačnice ter se stika na enak način z drugo verigo dsRNA. Glede na ta model bi lahko TLR3 aktivirale tudi zelo kratke dsRNA, krajše od 20 bp, vendar raziskave kažejo, da je meja za aktivacijo 21 bp, za stabilno vezavo pa 39 do 48 bp (Botos in sod., 2009; Leonard in sod., 2008).

Hipoteza

Na podlagi znanega smo postavili hipotezo. Predvidevali smo, da ektodomena receptorja TLR3 vsebuje še **drugo mesto za vezavo RNA**, ki se nahaja na ohranjenem **N-končnem segmentu domene**, bogate z levcini. Glede na kristalno strukturo in poravnavo aminokislinskih zaporedij ektodom en živalskih TLR3 smo opazili **skupino pozitivno nabitih aminokislinskih ostankov na N-končnem delu neglikozilirane strani ektodomene**. S pomočjo strukturnega modela sidranja dveh ektodom en TLR3 na dsRNA in modeliranja samega dimera smo identificirali posamezne aminokislinske ostanke, ki bi lahko bili odgovorni za

vezavo in s tem za aktivacijo. To vezavno mesto ima strukturo, ki je podobna strukturi na C-končnem segmentu, kar je pričakovano glede na simetrični dimerni ligand. Omenjeno mesto vsebuje dva histidinska ostanka (H39 in H60), ki sta zaradi protonacije pod pH 6 odgovorna za aktivacijo samo v kislem pH, kar dodatno prepreči prepoznavanje lastnih molekul dsRNA.

Predpostavili smo, da je za aktivacijo potrebno, da stimulirajoča RNA premosti razdaljo med dvema mestoma na ektodomene TLR3. Ta model tako istočasno izključuje aktivacijo s fragmenti dsRNA, ki so krajši od potrebne dolžine ki ustreza razdalji med obema mestoma. Meja za aktivacijo je tako 21 baznih parov dolga dsRNA.

Zastavili smo si naslednje cilje, ki smo jih vse tudi realizirali:

- **potrditev obstoja drugega vezavnega mesta za dsRNA na ektodomeni TLR3**
- **identifikacija aminokislinskih ostankov in vrste interakcij, vpletenih v vezavo**
- **določitev zaporedja RNA potrebnega za aktivacijo TLR3 in biološko relevantne substrate poleg poli(I:C)**
- **določitev prostorske dinamike native oblike in mutant receptorja TLR3.**

Podrobnejše informacije o mehanizmu delovanja receptorja TLR3, ki smo jih dobili s študijo, pomenijo mejniki na tem področju, saj je to prva molekularna karakterizacija prepoznavanja z receptorji TLR. Hkrati predstavlja dober model za mehanizem delovanja drugih receptorjev TLR (TLR 7, 8 in 9), ki prav tako prepoznavajo nukleinske kisline.

Z usmerjeno mutagenezo gena za človeški TLR3 smo spremenili aminokislinske ostanke domnevnega N-končnega vezavnega mesta (H39, H60, Q62, R64 in R65) v negativno nabite aspartate ali glutamate ter alanine. Mutacije s spremembo naboja bi nam pokazale potencialen odboj liganda v vezavnem mestu, mutacije v alanin pa vpliv izgube elektrostatske interakcije na vezavo liganda. H39 in H60 smo spremenili tudi v arginin, ki je pozitivno nabit v večini pH območja, medtem ko so imidazolne skupine histidinov nabite pozitivno le v kislem pH. Arginini bi omogočili vezavo liganda tudi v nevtralnem pH. Test aktivacije v celični kulturi je pokazal popolno izgubo aktivnosti mutant H39E, H39A, H60E in H60A, kar pomeni, da prispevata elektrostatski interakciji teh ostankov z dsRNA ključen delež k vezavi (Slika 1 v prilogi). Ostanka R64 in R65 verjetno nista dovolj blizu, da bi vezala dsRNA, saj sprememba naboja ni povzročila odboja in zmanjšanja sposobnosti aktivacije. Tudi mutanti Q62E in Q62A sta pokazali močno zmanjšano sposobnost aktivacije. Z metodami molekulskega kloniranja smo pripravili genske fuzijske konstrukte nemutiranega TLR3 (wtTLR3) in mutant z zapisom za fluorescentni protein mCerulean na C-terminalnem delu. S konfokalno mikroskopijo smo pokazali, da je znotrajcelična razporeditev mutant in wtTLR3 enaka, in sicer se nahajajo v membranah endoplazemskega retikuluma (Slika 2 v prilogi). S prenosom in hibridizacijo western smo pokazali, da je nivo izražanja vseh mutant primerljiv z nemutiranim receptorjem, kar pomeni, da izguba aktivnosti mutant ni bila posledica nepravilnega izražanja.

Ugotovili smo, da je razdalja med že znanim C-končnim vezavnim mestom in novo odkritim N-končnim mestom 50 Å, kar ustreza dolžini dveh zavojev dsRNA konformacije A, medtem ko je B-RNA bolj raztegnjena (Slika 4 v prilogi). Sintetična oligonukleotida A- in B-DNA sta inhibirala vezavo poli(I:C) na wtTLR3

pri testu ELISA ter sposobnost aktivacije v celični kulturi. Inhibicija z A-DNA je bila bistveno močnejša (Slika 3 v prilogi). DNA ne aktivira TLR3 verjetno zaradi odsotnosti 2'-hidroksilne skupine, je pa sposobna vezave in inhibicije, kot dokazujejo naši rezultati. A-DNA zaradi dolžine zavoja verjetno interagira z vezavnima mestoma, vendar z nižjo afiniteto zaradi odsotnosti 2'-hidroksilne skupine in zato ene vodikove vezi manj. Interakcija z B-DNA je zaradi daljšega zavoja šibkejša, posledica je tudi blažja inhibicija.

S konfokalno mikroskopijo smo pokazali, da se wtTLR3 nahaja v membranah endoplazemskega retikuluma in se ob stimulaciji z ligandom poli(I:C) premakne v endosome. CD spektroskopija je pokazala, da ima tudi sintetična molekula dsRNA poli(A:U) konformacijo tipa A in prav tako aktivira TLR3 v celični kulturi. Sposobnost aktivacije je manjša, verjetno zaradi drugačnega mehanizma vnosa v celice ali manjše odpornosti proti hidrolizi. S konfokalno mikroskopijo smo pokazali, da fluorescentno označen poli(A:U) kolokalizira s TLR3 v endosomih.

Istočasno in neodvisno od naših raziskav je bila določena kristalna struktura mišje ektodomene TLR3 s 46 bp dolgo dsRNA (Liu in sod., 2008) in obe skupini sta predstavili rezultate na isti Keystonski konferenci. Struktura receptorskega skupka in usmerjena mutageneza sta potrdili obstoj N-končnega vezavnega mesta. V strukturi je vidno, da obe vezavni mesti interagirata samo s fosfatnim in riboznim ogrodjem dsRNA, našli pa so tudi mesto homotipske interakcije med samima ektodomenama preko njunih C-končnih z levcini bogatih ponovitev. V receptorskem skupku, ki je viden iz kristalne strukture, je razdalja med N-končnima vezavnima mestoma maksimalna in ustreza dolžini 46 bp dolge dsRNA (Slika 5 v prilogi). To je verjetno najbolj stabilna ureditev, ni pa edina. Kompleks v kristalni strukturi namreč ne razloži meje aktivacije s kratkimi, 21 do 40 bp dolgimi dsRNA, med njimi tudi siRNA.

V objavi naših rezultatov s člankom v strokovni reviji Nature Structural and Molecular Biology smo predpostavili model vezave, v katerem sta ektodomeni zamaknjeni za dolžino enega zavoja bližje skupaj, posledica je večja razdalja med C-končnima vezavnima mestoma, kar pa ne bi smelo ovirati dimerizacije domen TIR (Slika 5 v prilogi). Po našem modelu se lahko veže na TLR3 in ga tudi aktivira 21 bp dolga dsRNA, kot je siRNA.

Naš projekt je razložil selektivnost receptorja TLR3 do različnih dsRNA, ki se razlikujejo tako glede velikosti, nukleotidnega zaporedja kot tudi lokalizacije v veziklih. *Predlagan način prepoznavanja je neodvisen od specifičnega nukleotidnega zaporedja ampak prepoznava nukleotidna zaporedja, ki zavzamejo obliko linearne vijačnice dsRNA s konformacijo tipa A.* Z rezultati smo pojasnili tudi **konformacijsko hipotezo aktivacije interferonskega odziva**. Ta pravi, da aktivira interferon tipa I samo dsRNA s konformacijo tipa A. **TLR3 je s svojima dvema vezavnima mestoma kot molekularno ravnilo, ki prepoznava A-tip dsRNA, ne pa telesu lastnih RNA ali dsDNA.**

DRUGI DEL: Mehanizem aktivacije TLR3 s siRNA

Vedno več virov poroča, da je eden od škodljivih stranskih učinkov terapevtske uporabe siRNA aktivacija imunskega odziva, pri čemer naj bi bil ključen receptor TLR3 (Cho in sod., 2009; Kariko in sod., 2004a in b; Kleinman in sod., 2008). siRNA so molekule dvoverižne RNA, ki imajo 19 do 21 bp dolg dvoverižni del in po dva prosta ribonukleotida na visečem 3' koncu vsake verige. Konformacijsko ustrezajo siRNA tipu A. S tem izpolnjujejo vse pogoje za vezavo in aktivacijo

TLR3. V drugem delu raziskave smo se osredotočili na aktivacijo TLR3 s siRNA in na iskanje načinov modifikacije molekul siRNA, da bi te ohranile sposobnost utišanja, a izgubile neugodna imunostimulatorne stranske učinke. Model vezave, ki smo ga objavili v članku Pirher in sod., 2008 predvideva interakcijo TLR3 z 21 bp dolgo dsRNA. To je natanko dolžina siRNA. Le-ta bi se na TLR3 vezala preko N- in C-končnega vezavnega mesta s 1. in 2. ribonukleotidom s 5'-konca verige ali 3. in 4. ribonukleotidom s 3'-konca verige (Slika 5 v prilogi). Naš **cilj** je bil **pokazati aktivacijo naravne imunosti s siRNA preko TLR3 in poiskati kemijsko modifikacijo siRNA, ki bi ohranila sposobnost utišanja in izgubila sposobnost aktivacije TLR3**. V ta namen smo uporabili siRNA, ki so bile metilirane na 1. in 2. ribonukleotidu s 5'-konca smiselne verige ali na 3. in 4. ribonukleotidu s 3' smiselne verige. Domnevali smo, da tako modificirane siRNA ne bodo sprožile imunskega odziva, saj jim je onemogočena vezava na TLR3, ohranile pa bodo sposobnost utišanja tarčnih genov. V celicah HEK293, stabilno transficiranih z zapisom za TLR3 smo pokazali, da vnos siRNA s transfekcijo aktivira IFN β po poti, ki ni odvisna od TLR3. Verjetno aktivira citosolne receptorje, kot sta RIGI in MDA-5. Z neposrednim dodatkom siRNA v gojišče celic, ki izražajo TLR3 na površini aktivacije nismo zasledili.

V nadaljevanju smo se osredotočili na aktivacijo TLR3 na površini primarnih celic, o čemer poroča več virov (Cho in sod., 2009; Kariko in sod., 2004a in b; Kleinman in sod., 2008). Uporabili smo primarne celice človeškega limfnega endotelija (HMVEC dLyAd), ki izražajo TLR3 na svoji površini (Pegu in sod., 2008), in pokazali, da jih aktivirata tako poli(I:C) kot tudi neposredno dodana siRNA. Z metodo PCR v realnem času smo zasledovali relativno količino mRNA citokinov in kemokinov v primerjavi z nestimuliranimi celicami. Celice smo stimulirali z neposredno v gojišče dodanimi metiliranimi in nemetiliranimi siRNA proti zelenemu fluorescentnemu proteinu (anti-EGFP), poli(I:C) ter kontrolnimi RNA ali DNA oligonukleotidi. Spremljali smo relativne količine mRNA citokinov ali kemokinov v primerjavi z nestimuliranimi celicami. Poli(I:C) je povzročil povečanje števila kopij mRNA kemokinov CXCL10, CXCL11 in RANTES, od katerih je slednji neposredno odvisen od aktivacije TLR3 (Slika 6 v prilogi). Med citokini je sprožil poli(I:C) povečanje količine mRNA IL-6, IL-8 in IFN β . Tako metilirana, kot tudi nemetilirana siRNA anti-EGFP sta sprožili aktivacijo CXCL10 in CXCL11, ne pa RANTES. Sklepali smo, da je aktivacija z metiliranimi siRNA neodvisna od TLR3. Metilacija dveh nukleotidov v smiselni verigi siRNA ni bila dovolj, da bi preprečila aktivacijo imunskega odziva, ne izključujemo pa možnost, da siRNA poleg TLR3 aktivira tudi druge mehanizme naravne imunosti.

Nemetilirana siRNA je po 8 h stimulacije povzročila povišanje nivoja IL-1 α , IL-6, IL-8 in TNF α . S predinkubacijo celic z monoklonskimi protitelesi, ki prepoznavajo peptid okrog N-končnega vezavnega mesta, smo dosegli zmanjšanje aktivacije mRNA citokinov IL-1 α , IL-6 in TNF α (Slika 7 v prilogi). To pomeni, da aktivacija TLR3 na površini celic HMVEC-dLyAd povzroči nastajanje vnetnih citokinov, verjetno preko transkripcijskega dejavnika NF- κ B. Nivo mRNA IFN β in IL-8 se zaradi predinkubacije s protitelesi ni zmanjšal (Slika 7 v prilogi). V tem primeru ni prišlo do inhibicije, verjetno zato, ker je bil aktiviran TLR3 v endosomih, kjer ni dostopen za inhibicijo s protitelesi. Tudi poli(I:C) aktivira TLR3 v endosomih, kjer se aktivira interferonski odziv preko transkripcijskega dejavnika IRF3.

Pokazali smo, da 21 bp dolga siRNA aktivira tudi celice HEK293, transficirane z zapisom za TLR3 in protein UNC93B1. UNC93B1 je transmembranski protein, ki skrbi za transport TLR3, TLR7 in TLR9 z membrane endoplazemskega retikuluma do endosomov ali celične membrane (Tabeta in sod., 2006). V naših

poskusih se je ob kotransfekciji z zapisom za UNC93B1 povečalo izražanje TLR3 na celični površini (konfokalni mikroskop in pretočna citometrija) (Slika 8 v prilogi). To je omogočilo aktivacijo s siRNA, ki smo jo uspeli inhibirati s protitelesi proti N-terminalnemu vezavnemu mestu TLR3. Bafilomicin, ki inhibira aktivacijo s poli(I:C), tako da prepreči zakisanje endosomov, ni inhibiral aktivacije s siRNA. Na podlagi tega sklepamo, da aktivira siRNA TLR3 na celični površini. Mehanizem, ki razveji signalizacijo proti vnetnemu odzivu ali interferonskemu odzivu, je zaenkrat neznan in bo predmet naših nadaljnjih raziskav.

Viri:

Bell J.K. in sod. 2006a. The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 23: 8792-8797.

Botos I. in sod. 2009. The toll-like receptor 3:dsRNA signaling complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1789, 9: 667-674.

Cho W.G. in sod. 2009. Small interfering RNA-induced TLR3 activation inhibits blood and lymphatic vessel growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 17: 7137-7142.

Kariko K. in sod. 2004a. Exogenous siRNA mediates sequence-independent gene suppression by signaling through toll-like receptor 3. *Cells Tissues Organs*, 177, 3: 132-138.

Kariko K. in sod. 2004b. Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *Journal of Immunology*, 172, 11: 6545-6549.

Kleinman M.E. in sod. 2008. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*, 452, 7187: 591-597.

Leonard J.N. in sod. 2008. The TLR3 signaling complex forms by cooperative receptor dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 1: 258-263.

Botos I. in sod. 2009. The toll-like receptor 3: dsRNA signaling complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1789, 9: 667-674.

Pegu A. in sod. 2008. Human lymphatic endothelial cells express multiple functional TLRs. *Journal of Immunology*, 180, 5: 3399-3405.

Ranjith-Kumar C.T. in sod. 2007. Biochemical and functional analyses of the human Toll-like receptor 3 ectodomain. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 10: 7668-7678.

Tabeta K. in sod. 2006. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nature Immunology*, 7, 2: 156-164.

4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

Realizirali smo vse pomembnejše cilje :

1. S ciljno mutagenezo smo potrdili obstoj N-terminalnega vezavnega mesta za

dsRNA na ektodomeni TLR3.

2. Potrdili smo obstoj že dokazanega C-terminalnega vezavnega mesta s ključnimi aminokislinskimi ostanki H539 in N541 in pokazali, da sta za aktivacijo potrebni obe vezavni mesti.
3. Pokazali smo, da sestavljajo N-terminalno vezavno mesto aminokislinski ostanki H39, H60 in Q62. Stranski skupini H39 in H60 sta v kislem okolju znotraj endosomov pozitivno nabiti, zato vežeta preko elektrostatskih interakcij z negativno nabitim fosfatnim ogrodjem dsRNA. Ostanek Q62 ima polarno stransko skupino, ki mu omogoča povezavo z 2'-OH skupino riboze dsRNA preko vodikove vezi. Ta interakcija omogoča receptorju razlikovanje med tujkom -dsRNA in lastno dsDNA, ki nima 2'-OH skupine.
4. Potrdili smo, da je izražanje mutant aminokislinskih ostankov vezavnih mest enako kot izražanje nativne oblike TLR3. Znotrajcelična lokalizacija je enaka, nahajajo se namreč v membrani endoplazemskega retikuluma. Nativna oblika TLR3 se po stimulaciji s poli(I:C) zbira v endosomih, kjer kolokalizira z ligandom. Tudi nivo sinteze receptorja in mutant v celični kulturi je primerljiv.
5. Ugotovili smo, da zaporedje nukleotidov dsRNA za aktivacijo TLR3 ni pomembno. Odločilna je konformacija vijačnice, ki mora ustrezati nukleinski kislini tipa A. S tem smo potrdili konformacijsko hipotezo aktivacije interferonskega odziva, ki že od sedemdesetih let prejšnjega stoletja trdi, da je za aktivacijo interferona tipa I ključna konformacija dsRNA, ki mora ustrezati tipu A. Odkrili smo alternativni ligand TLR3 poli(A:U), ki ima tako kot poli(I:C) vijačnico tipa A in aktivira receptor s primerljivo intenziteto.
6. Dokazali smo, da je TLR3 s svojima dvema vezavnima mestoma tisti, ki loči med tujimi in lastnimi nukleinskimi kislinami in sicer na podlagi prepoznavanja konformacije vijačnice dsRNA, ki mora ustrezati tipu A in na osnovi prepoznavanja 2'-OH skupine, ki loči dsRNA od dsDNA. Tako zagotavlja v telesu specifičnost imunskega odziva samo ob stiku z virusnimi dsRNA.
7. Dokazali smo, da aktivira TLR3 tudi siRNA, ki z dolžino dvojne vijačnice in konformacijo vijačnice tipa A ustreza dimenzijam, potrebnim za vezavo na receptor in njegovo aktivacijo.
8. Pokazali smo, da protein UNC93B1 ob kotransfekciji z zapisom za TLR3 v celicah povzroči izražanje receptorja TLR3 tudi na celični površini in ojači aktivacijo s siRNA.

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁵

Ni bilo sprememb.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

Znanstveni rezultat		
1.	Naslov	<p><i>SLO</i> Odkritje drugega vezalnega mesta za dvoverižno RNA na TLR3 in njegov pomen za aktivacijo interferonov</p> <p><i>ANG</i> A second binding site for double-stranded RNA in TLR3 and consequences for interferon activation.</p>
	Opis	<p><i>SLO</i> Receptor TLR3 prepozna infekcijo z virusi preko dvoverižne RNA. Odkrili smo obstoj dodatnega mesta za RNA, tako da se le-ta veže na dve mesti na ektodomeni TLR3, ki sta oddaljeni 50 Å, kar določa prepoznavanje samo daljših segmentov RNA. Poseben pomen našega dela je v spoznanju, da se lahko tudi siRNA, ki obsega 21 bp veže na TLR3 in na ta način povzroči nespecifični odziv na terapijo s siRNA. Delo smo predstavili na več vabljenih predavanjih v tujini (IEIIS Edinburgh 2008, Austrian society of immunology and allergology, Dunaj 2010, U.Cambridge, U.Heidelberg...).</p>

		ANG	TLR3 receptor recognizes stranded RNA, which is characteristic for several viruses. We have discovered the RNA binding site at N-terminus. TLR3 dimerization requires binding of RNA to both binding sites. We showed that siRNA comprising 21 bp represents the minimal size of RNA duplex that can bind to both binding sites of TLR3 ectodomain and causes nonspecific interferon production. Those results were presented in several invited lectures (IEIIS Edinburgh 2008, Austrian society of immunology and allergology, Vienna 2010, U.Cambridge, U.Heidelberg).
	Objavljeno v		PIRHER, Nina, IVIČAK, Karolina, POHAR, Jelka, BENCINA, Mojca, JERALA, Roman. A second binding site for double-stranded RNA in TLR3 and consequences for interferon activation. Nature structural & molecular biology. 15, p. 761-763.
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		3954714
2.	Naslov	SLO	PANTER, Gabriela, KUŽNIK, Alenka, JERALA, Roman. terapevtska uporaba nukleinskih kislin kot ligandov Tollu-podobnih receptorjev.
		ANG	ANTER, Gabriela, KUŽNIK, Alenka, JERALA, Roman. Therapeutic applications of nucleic acids as ligands for toll-like receptors.
	Opis	SLO	V tem članku smo opisali uporabo nukleinskih kislin, ki aktivirajo ali inhibirajo Tollu-podobne receptorje, kjer smo se naslanjali na rezultate aktivacije TLR3, TLR9, ter TLR7 s TLR8 iz našega laboratorija ter drugih. Razumevanje molekularnega mehanizma aktivacije, ki smo ga pojasnili je bistveno za načrtovanje boljših zdravilnih učinkovin.
		ANG	We described the application of nucleic acids that activate or inhibit Toll-like receptors TLR3, TLR9, and TLR7 with TLR8 based on results from our group and from the literature. Understanding of the molecular mechanism of activation is essential for the improved drug design.
	Objavljeno v		Curr. opin. mol. ther. (Print), 2009, vol. 11, no. 2, str. 133-145.
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
COBISS.SI-ID		4121114	
3.	Naslov	SLO	Prepoznavanje nukleinskih kislin preko Tollu-podobnih receptorjev in razvoj imunomodulatornih spojin.
		ANG	KUŽNIK, Alenka, PANTER, Gabriela, JERALA, Roman. Recognition of nucleic acids by toll-like receptors and development of immunomodulatory drugs.
	Opis	SLO	Nedavna odkritja so bistveno izboljšala naše razumevanje molekularnih mehanizmov endosomalnih TLRs in njihove fiziološke vloge. Med njimi je tudi prepoznavanje dsRNA preko dveh mesta za vezavo nukleinskih kislin na ektodomein TLR3, aktivacija TLR9 z enoverižno DNA s fosfodiesterskim ogrodjem, ki je neodvisna od zaporedja nukleotidov in vlogo proteolize v aktivaciji TLR9. Obstaja vedno več dokazov, ki podpirajo vključevanje endosomalnih TLR v več avtoimunskih boleznih, kar kaže terapevtski potencial imunomodulatornih endosomalnih TLR ligandov.
		ANG	Recent discoveries significantly improved our understanding of molecular mechanism of endosomal TLRs and their physiological role. Those include recognition of dsRNA through two nucleic acid binding sites of TLR3 ectodomain, activation of TLR9 by phosphodiester backbone of ssDNA, independent of the nucleotide sequence and phosphorothioate modified bonds, and the role of proteolysis in activation of TLR9. There is growing evidence that supports involvement of endosomal TLRs in a number of autoimmune diseases, suggesting a therapeutic potential of immunomodulatory endosomal TLR ligands.
	Objavljeno v		Curr. med. chem., 2010, vol. 17, no. 36, 16 str.,
	Tipologija		1.02 Pregledni znanstveni članek
COBISS.SI-ID		4351258	
4.	Naslov	SLO	Molekulski mehanizem inhibicije endosomalnih TLR z antimalariki
		ANG	Mechanism of endosomal TLR inhibition by antimalarial drugs and imidazoquinolines
			V članku v ugledni reviji s področja imunologije smo objavili odkritje mehanizma delovanja antimalarikov, podobnih kvinakrinu. V nasprotju s prevladujočim mnenjem v literature smo odkrili da ti inhibitorji v terapevtskih koncentracijah ne preprečijo zakisanja endosomov temveč se

Opis	SLO	direktno vežejo na nukleinske kisline. Na ta način preprečijo, da nukleinske kisline aktivirajo endosomalne TLR kot so TLR3, TLR9 in TLR7. Rezultat je posebej pomemben za izboljšanje terapije avtoimunskih bolezni, za katere je značilna aktivacija TLR9,7 8 in 3.
	ANG	In this article in the respected journal in the field of immunology, we reported the discovery of the mechanism of action antimalarials that are similar to quinacrin. In contrast to the prevailing opinion in literature we discovered that these inhibitors at therapeutic concentrations do not prevent endosomal acidification but directly bind to the nucleic acid. In this way they prevent the nucleic acid to activate endosomal TLRs such as TLR3, TLR7 and TLR9. The result is a significant particularly for the improvement of treatment of diseases characterized by activation of TLR9, 7, 8 and 3.
Objavljeno v	J.Immunol.	
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
COBISS.SI-ID	2971761	
5.	Naslov	SLO
		ANG
	Opis	SLO
		ANG
	Objavljeno v	
	Tipologija	
	COBISS.SI-ID	

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine⁶

Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat			
1.	Naslov	SLO	Zoisovo priznanje za vrhunske znanstvene dosežke na področju molekularne biologije in biotehnologije
		ANG	Zois award for the outstanding scientific achievements in molecular biology and biotechnology
Opis	SLO	Rezultati na področju raziskav tega projekta so pomembni pripomogli k dosežkom, ki so bili osnova za podelitev nagrade.	
	ANG	Results on the molecular recognition by TLR3 of this project contributed significantly to this award.	
	Šifra	E.01 Domače nagrade	
	Objavljeno v	Ministrstvo za visoko šolstvo, znanost in tehnologijo Republike Slovenije, 23. november 2009.	
	Tipologija	3.25 Druga izvedena dela	
	COBISS.SI-ID	4330266	
2.	Naslov	SLO	Pogled v prihodnost : [sodelovanje v oddaji Studio ob sedemnajstih].
		ANG	Look into the future : [radio emission Stzudio ob sedemnajstih].
Opis	SLO	V oddaji Pogled v prihodnost je prof. Jerala na poljuden način predstavi dosežke in napovedi za nove rezultate na področju imunologije, s poudarkom na TLR.	
	ANG	In the emission Look into the future prof. Jerala presented to the general public some recent achievements and prospects for the future in the area of immunology, particularly with emphasis on TLRs.	
	Šifra	F.30 Strokovna ocena stanja	
	Objavljeno v	Radio Slovenija, 1. program, 5. jan. 2009. 60 min.	
	Tipologija	3.11 Radijski ali TV dogodek	
	COBISS.SI-ID	4188442	
3.	Naslov	SLO	Doktorat Nine Priher
		ANG	PhD degree of Nina Pirher based on the project
	Opis	SLO	Na osnovi rezultatov tega projekta je mlada raziskovalka Nina Pirher uspešno zagovarjala doktorsko delo.

		ANG	Based on the results of this project Nina Pirher defended her PhD at the University of Ljubljana.
Šifra	D.09		Mentorstvo doktorandom
Objavljeno v	Mehanizem signalizacije dvoverižne RNA preko receptorja TLR3 : doktorska disertacija (s področja biotehnologije) = The mechanism of double stranded RNA signalling through receptor TLR3 : doctoral dissertation. Ljubljana: [N. Pirher]: [Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti]		
Tipologija	2.08		Doktorska disertacija
COBISS.SI-ID	3808376		
4.	Naslov	SLO	Vabljen predavanje v podjetju Alnylam Pharmaceuticals v Cambridge, MA, ZDA
		ANG	Invited lecture in the company Alnylam Pharmaceuticals in Cambridge, MA, USA
Opis	SLO	V predavanju v podjetju, ki obvladuje večino patentov s področja terapevtskega utišanja RNA sem predstavil mehanizem aktivacije TLR3, ki je zelo pomemben za uporabo omenjene tehnologije.	
	ANG	In the company that holds the most important patents on the use of siRNA I have presented our discoveries of the mechanism of TLR3 activation that is most important for the therapeutic use of this technology.	
Šifra	B.04		Vabljen predavanje
Objavljeno v	Anlylam, Cambridge, MA, ZDA		
Tipologija	3.14		Predavanje na tuji univerzi
COBISS.SI-ID	4186138		
5.	Naslov	SLO	Vabljen predavanje na srečanju avstrijskega društva za alergologijo in imunologijo, Dunaj, December 5, 2010.
		ANG	Lecturer presented at the Annual meeting of the Austrian society for allergology and immunology (ÖGAI), December 5, 2010. Vienna, 2010
Opis	SLO	V tem vabljenem predavanju sem predstavil naše rezultate o mehanizmu aktivacije TLR in relevanci tega za razvoj vnetnih obolenj.	
	ANG	In this invited lecture I presented our results on the mechanism of TLR activation and ther relevance for the development of inflammatory diseases.	
Šifra	B.04		Vabljen predavanje
Objavljeno v	Book of abstracts: Annual meeting of the Austrian society for allergology and immunology (ÖGAI), Lecture Centre of the Vienna General Hospital Vienna, Austria, Friday, December 3-Sunday, December 5, 2010. Vienna, 2010		
Tipologija	3.16		Vabljen predavanje na konferenci brez natisa
COBISS.SI-ID	4577562		

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

--

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

9.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

Projekt je pomembno doprinesel k razvoju znanosti o življenju z odkritji na področju mehanizma aktivacije enega od receptorjev TLR z virusno dvoverižno RNA (dsRNA). Te ugotovitve so pomembne za razumevanje obrambe imunskega sistema proti virusnim okužbam, ki so eden od glavnih razlogov za zdravstvene težave sodobnega časa. Biokemijske osnove interakcije med ektodomeno TLR3 in ligandom dsRNA bodo pomagale tudi pri raziskovanju mehanizma aktivacije drugih receptorjev TLR, ki zaznavajo nukleinske kisline. Spoznanja so medicinskega in biotehnološkega pomena, saj lahko doprinesejo k načrtovanju cepiv tako proti virusnim okužbam, kot tudi proti drugim boleznim, kjer delujejo ligandi TLR3 kot adjuvansi za ojačitev specifičnega imunskega odziva. Raziskava je po naravi interdisciplinarna. Združuje biokemijska dognanja o medmolekulskih interakcijah z znanjem o strukturi nukleinskih kislin, ki

so tehtna z biotehnoškemu in medicinskemu vidiku. Rezultati so pomembni predvsem za področje medicine z nedvomnim vplivom na izboljšanje zdravja človeka. Poglobljeno znanje, ki smo ga pridobili s študijo, bo omogočilo boljše načrtovanje agonistov in antagonistov, ki bi bili uporabni kot cepivo, zdravilo proti raku ali kot proti-vnetne učinkovine za zdravljenje artritisa, sistemskega lupusa eritematosusa (SLE), ateroskleroze, avtoimunskega encefalitisa in drugih. Projekt je bil pomemben tudi za izobraževanje dodiplomskih in podiplomskih študentov, ki so sodelovali pri posameznih segmentih študije. Tekom dela so pridobili pomembna znanja o laboratorijskem delu in znanstveni metodologiji ter so tako postali pomemben člen prihodnosti slovenske znanosti.

ANG

The project contributed significantly to the development of biological sciences, specifically with findings in the field of viral dsRNA recognition by one of the TLR receptors of innate immunity. This is important for understanding the immune response and defense against viral infections, which are one of the leading causes for modern life health problems. The biochemical basis of interactions between the dsRNA ligand and the TLR3 ectodomain will also help in exploring activation mechanisms of other TLRs that detect nucleic acids. Our findings have medical and biotechnological importance due to their possible contribution to the design of vaccines against viral infections and other diseases where the TLR3 ligand has an adjuvant function for priming of the specific immune response. The novel use of transferrin-poly-L-lysine conjugates for targeted delivery of TLR3 and TLR9 ligands will have a positive impact on finding new ways for cancer treatment. The study is interdisciplinary. It combines biochemical knowledge about intermolecular interactions with the knowledge about nucleic acid structure and thus has biotechnological and medical relevance. It also contributes to the pool of knowledge in the field of innate immunity, particularly in the field of pathogen-detection mechanisms. The results are thereby particularly important in the field of medicine with a significant impact on improving human health. The in-depth knowledge we have gained from the study will lead to better design of agonists and antagonists, which can be useful as a vaccines or cures for cancer or anti-inflammatory agents for treatment of arthritis, systemic lupus erythematosus (SLE), atherosclerosis, autoimmune encephalitis and others. The project had also a significant educational role for PhD and graduate students, who during their work on segments of the study were able to gain very valuable knowledge in scientific methodology and laboratory practice.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

V Sloveniji sodi naš laboratorij med pionirje na področju raziskav naravne imunosti, molekulske strukture in interakcij. Skrbimo za pomembno zalogo znanja za prihodnje generacije slovenskih znanstvenikov. Z izobraževanjem dodiplomskih in podiplomskih študentov doprinesemo pomemben delež h kakovosti in prepoznavnosti slovenske znanosti. Z udeležbami na tečajih in konferencah posredujemo naše znanje in izkušnje širši strokovni publiki. Znanje, ki smo ga pridobili tekom naše študije je ključno za boljše razumevanje molekularnega mehanizma aktivacije TLR3 z virusno dsRNA. Ta aktivacija je bistvena za takojšnji protivirusni imunski odziv, kot tudi za ojačitev specifičnega imunskega odziva. Proučili smo vlogo pozitivno nabitih aminokislinskih ostankov blizu N-terminalnega konca ektodomene TLR3 in ugotovili, da sestavljajo drugo vezavno mesto za dsRNA. Ugotovili smo tudi, da vezavni mesti interagirata samo s fosfatnim ogrodjem, ter da razdalja med njima ustreza natanko dolžini dveh zavojev dsRNA s konformacijo tipa A. To ustreza konformacijski hipotezi, ki pravi, da je edina oblika dsRNA, ki lahko aktivira TLR3, konformacijski tip A. Pokazali smo, da lahko TLR3 z razdaljo med obema vezavnima mestoma ločuje dsRNA od drugih nukleinskih kislin in tako deluje kot molekularno ravnilo za ločevanje lastnih nukleinskih kislin od tujih. Rezultati naše raziskave so bili objavljeni v visoko priznani znanstveni reviji Nature Structural and Molecular Biology ter predstavljeni na številnih konferencah z mednarodno udeležbo. Na ta način smo predstavili visoko raven slovenske znanosti in doprinesli k njeni prepoznavnosti v svetu. Rezultati raziskovalnega projekta so tudi ekonomsko pomembni, zanimivi za biotehnologijo in farmacevtsko industrijo ter lahko pomagajo pri izboljšanju zdravljenja številnih nalezljivih bolezni.

ANG

In our country our laboratory is a pioneer in the field of innate immunity, molecular-structure and interaction studies. We provide an important pool of knowledge for future generations of Slovenian researchers. Through training of graduate and PhD students we contribute importantly to the quality and world-wide visibility of Slovenian research. By attending courses and conferences we have passed on our findings and knowledge to a broader professional

public. The knowledge we gained with our study is key to better understanding of molecular mechanism of TLR3 activation by viral dsRNA. Recognition of dsRNA by TLR3 is essential for the anti-viral innate immune response and important for priming of acquired immunity. We investigated the role of positively charged amino acid residues near the N-terminus of the TLR3 ectodomain and found they constitute a second dsRNA-binding site. We also found out that the two binding sites interact only with the phosphate backbone and that the distance between them corresponds exactly to the length of two turns of A-type dsRNA. This also explains the conformational hypothesis, which states that the only form of dsRNA to activate TLR3 is the conformational type A. We have demonstrated that TLR3 with the distance between the two binding sites accurately distinguishes dsRNA from other nucleic acids, and thus functions as a molecular ruler to separate self and non-self nucleic acids. The results of our study were published in the high profile scientific journal Nature Structural and Molecular Biology and also presented at a number of conferences with international participation. By those means we represented the high level of Slovenian science and contributed to its world-wide recognition. The results of the research project are also of economic importance, of interest to biotechnology and pharmaceutical industry and can help to improve treatment of many infectious diseases.

10. Samo za aplikativne projekte!

Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri aplikativnem projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljaljskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>

	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	<input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	<input type="text"/>
F.35	Drugo	

Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
Rezultat	<input type="text"/>
Uporaba rezultatov	<input type="text"/>

Komentar

11. Samo za aplikativne projekte!**Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja**

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visoko-šolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo: <input type="text"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.06.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.09.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

Komentar

--

12. Pomen raziskovanja za sofinancerje, navedene v 2. točki [12](#)

1.	Sofinancer		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja		Šifra
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
2.	Sofinancer		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja		Šifra
	1.		
	Komentar		
	Ocena		
	Sofinancer		
Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR	
Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%	
Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja		Šifra	
1.			

	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
Komentar			
Ocena			
3.	Sofinancer		
Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:			EUR
Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:			%
Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja			Šifra
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
Komentar			
Ocena			

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja, za objavo 6., 7. in 8. točke na spletni strani <http://sicris.izum.si/> ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

Roman Jerala	in	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana

15.4.2011

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/109

¹ Zaradi spremembe klasifikacije družbeno ekonomskih ciljev je potrebno v poročilu opredeliti družbeno ekonomski cilj

po novi klasifikaciji. [Nazaj](#)

² Samo za aplikativne projekte. [Nazaj](#)

³ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja ter rezultate in učinke raziskovalnega projekta. Največ 18.000 znakov vključno s presledki (približno tri strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta (obrazložitev). V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁶ Navedite največ pet najpomembnejših znanstvenih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov v slovenskem in angleškem jeziku (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki) v slovenskem in angleškem jeziku, navedite, kje je objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote. Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>.

PRIMER (v slovenskem jeziku):

Naslov: Regulacija delovanja beta-2 integrinskih receptorjev s katepsinom X;

Opis: Cisteinske proteaze imajo pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju raka. Zadnje študije kažejo njihovo povezanost s procesi celičnega signaliziranja in imunskega odziva. V tem znanstvenem članku smo prvi dokazali... (največ 600 znakov vključno s presledki)

Objavljeno v: OBERMAJER, N., PREMZL, A., ZAVAŠNIK-BERGANT, T., TURK, B., KOS, J.. Carboxypeptidase cathepsin X mediates $\beta 2$ - integrin dependent adhesion of differentiated U-937 cells. Exp. Cell Res., 2006, 312, 2515-2527, JCR IF (2005): 4.148

Tipologija: 1.01 - Izvirni znanstveni članek

COBISS.SI-ID: 1920113 [Nazaj](#)

⁷ Navedite največ pet najpomembnejših družbeno-ekonomsko relevantnih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki), izberite ustrezen rezultat, ki je v Sifrantu raziskovalnih rezultatov in učinkov (Glej: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/sif-razisk-rezult.asp>), navedite, kje je rezultat objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.

Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>. [Nazaj](#)

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁹ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

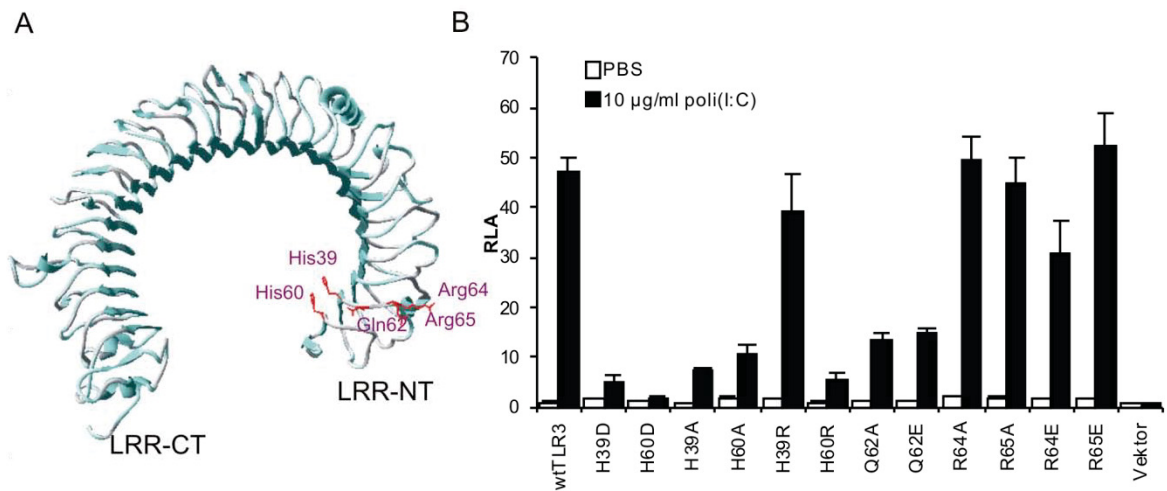
¹⁰ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

¹¹ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

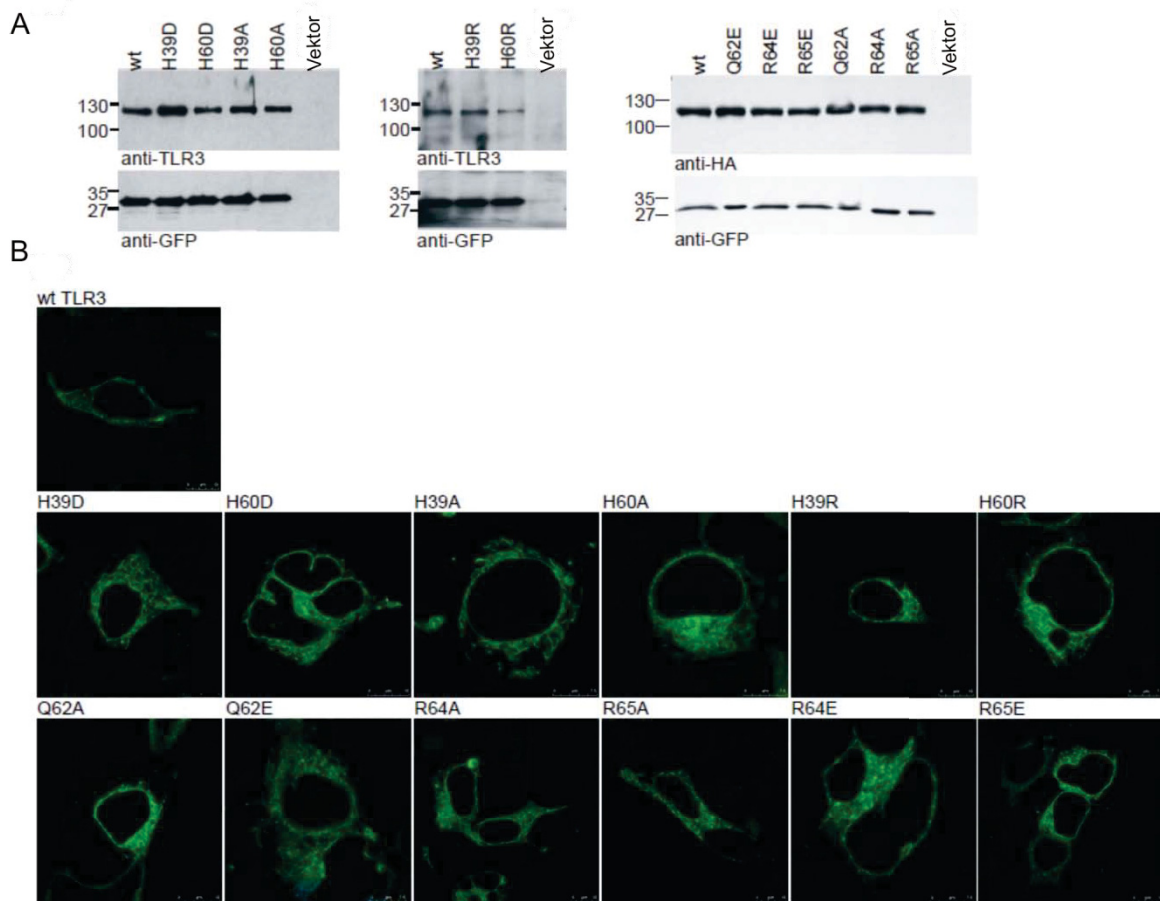
¹² Rubrike izpolnite/prepišite skladno z obrazcem "Izjava sofinancerja" (<http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>), ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2011-1 v1.01

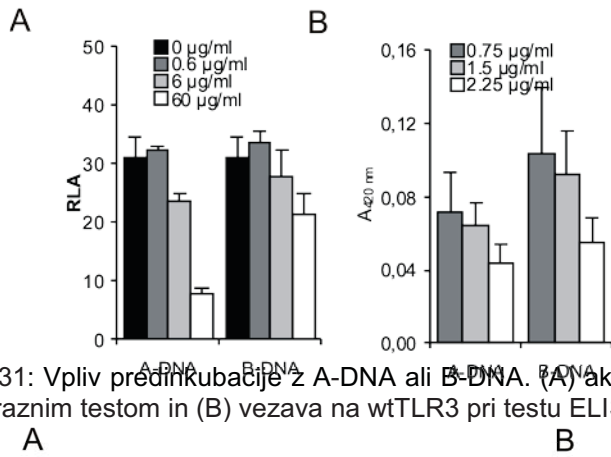
8A-C8-7B-4B-E9-8C-7F-5C-EE-15-93-E7-80-D1-7A-F0-32-00-F0-4B



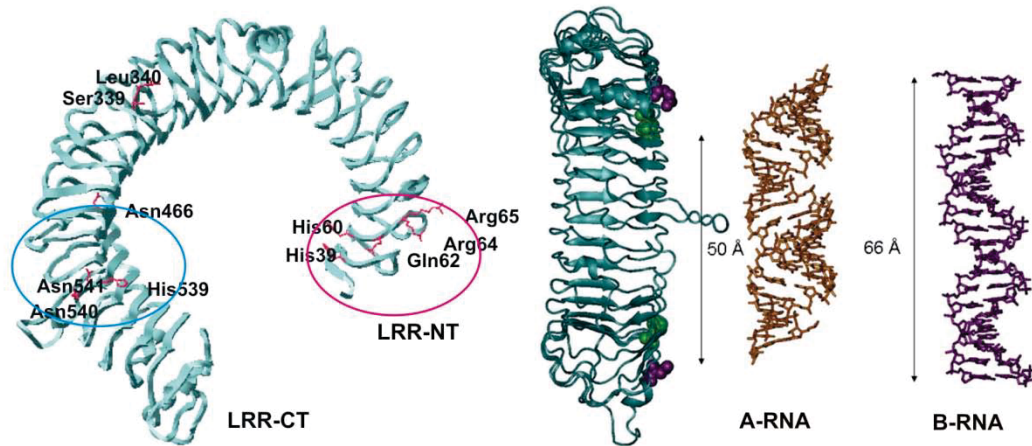
Slika 1: (A) Aminokislinski ostanki domnevnega N-končnega vezavnega mesta in (B) biološka aktivnost mutant v N-končnem vezavnem mestu v celicah HEK293.



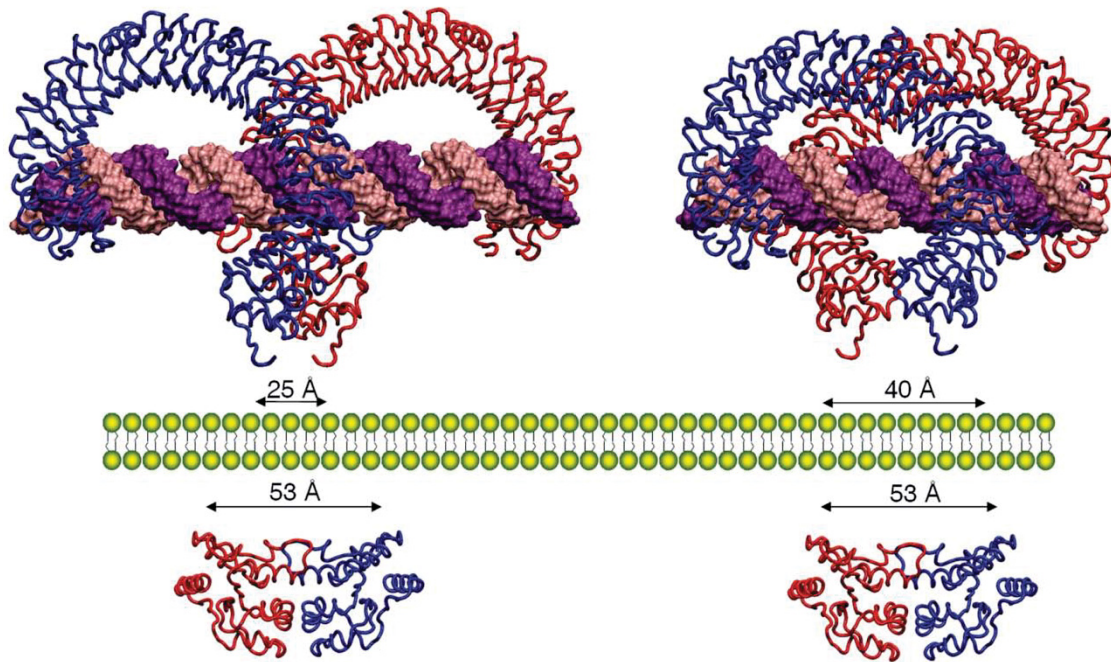
Slika 2: Primerjava nivoja izražanja wtTLR3 in mutant domnevnega N-končnega vezavnega mesta. (A) prenos western in imunodetekcija in (B) konfokalna mikroskopija.



Slika 31: Vpliv predinkubacije z A-DNA ali B-DNA. (A) aktivacija wtTLR3 v celicah HEK293 z dvojnimi luciferaznim testom in (B) vezava na wtTLR3 pri testu ELISA.



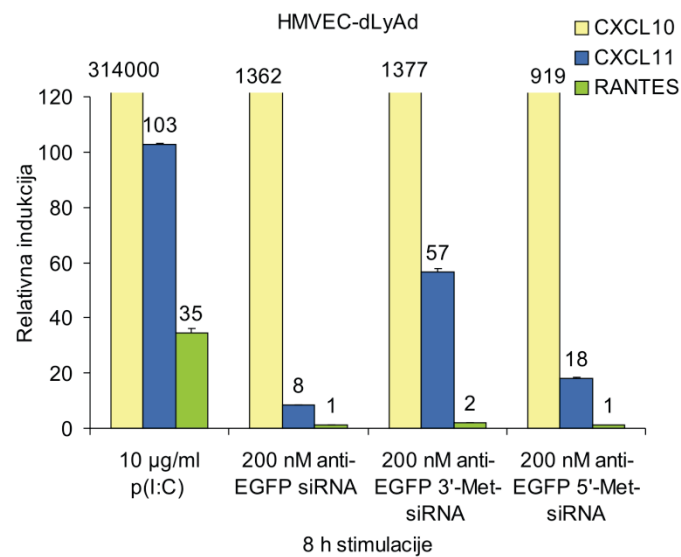
Slika 2: Vezavni mesti na ektodomeni TLR3, potrjeni z usmerjeno mutagenezo ločita med A- in B-RNA (Pirher in sod., 2008: 761).



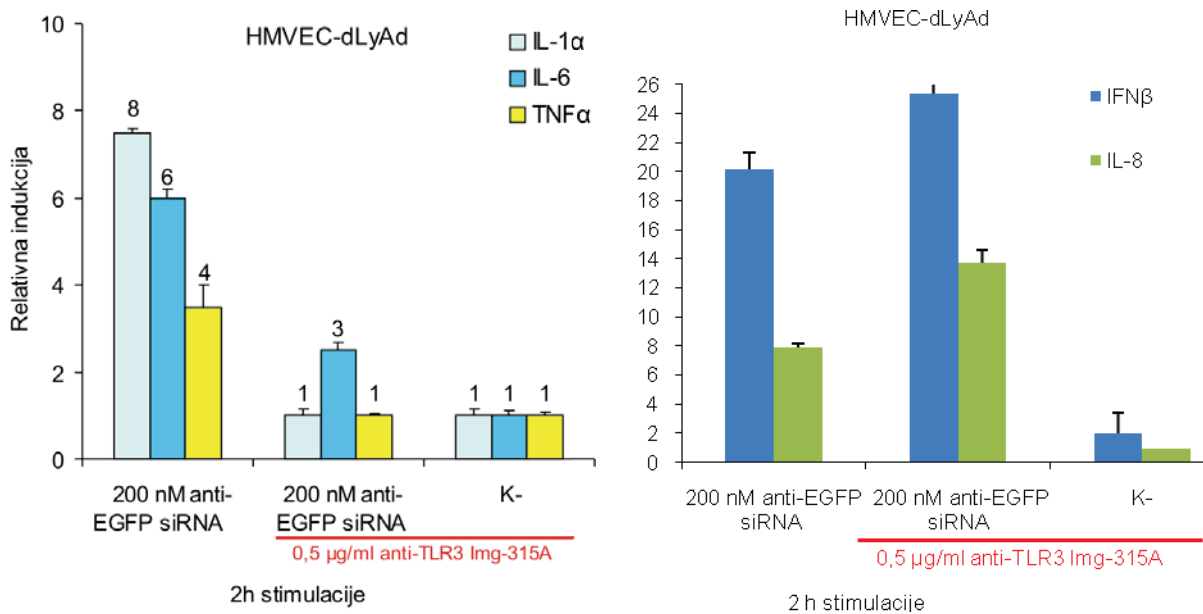
Slika 5: Za aktivacijo TLR3 z dsRNA sta potrebni dve vezavni mesti na ektodomeni TLR3. Levo: receptorski kompleks, viden iz kristalne strukture Liu in sod., 2008. Desno:



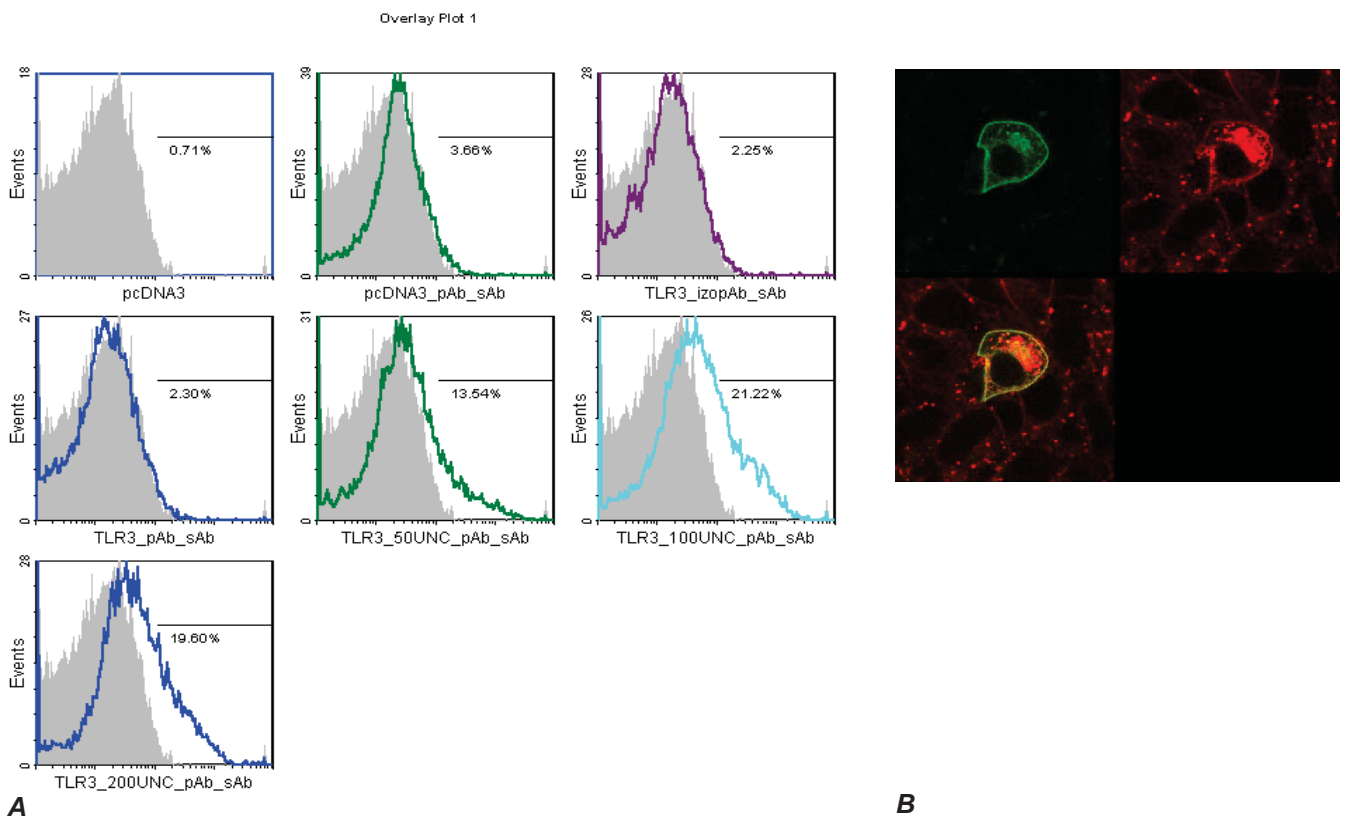
Slika 5: Različni pogledi na model vezave dveh ektodomen TLR3 in 23 nt dolge siRNA z 2 nt štrlečih koncev. siRNA je obarvana rumeno, N-končno vezavno mesto modro in C-končno vezavno mesto zeleno.



Slika 6: Relativna indukcija mRNA kemokinov v celicah HMVEC-dLyAd po 8 h stimulacije s poli(I:C) ali anti-EGFP siRNA.



Slika 7: Inhibicija indukcije mRNA citokinov v celicah HMVEC-dLyAd s protitelesom anti-TLR3.



Slika 8: Površinsko izražanje TLR3-mCerulean po kotransfekciji s plazmidom z zapisom za UNC93B1. **A:** Površinsko izražanje, izmerjeno na pretočnem citometru Epics Altra (Beckman Coulter) po barvanju z anti-TLR3 protitelesi, **B:** konfokalna mikroskopija (mikroskop Leica TCS SP5) celic HEK293, transficiranih z zapisi za TLR3-mCerulean in UNC93B1. Membrane so barvane s SynptoRED (Invitrogen).